

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 octobre 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/087918 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/10, 9/10, A61K 38/45

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000744

(22) Date de dépôt international : 25 mars 2004 (25.03.2004)

(25) Langue de dépôt : **français**

(26) Langue de publication : **français**

(30) Données relatives à la priorité :
03/03910 28 mars 2003 (28.03.2003) **FR**

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : KAMINSKI, Pierre-Alexandre [FR/FR]; 4, rue Bailly, F-75003 Paris (FR).

(74) Mandataire : SANTARELLI; 14, avenue de la Grande Armée, B.P. 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: **18 novembre 2004**

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR THE IN VIVO MODIFICATION OF THE SYNTHESIS ACTIVITY OF A METABOLITE BY MEANS OF THE MODIFICATION OF A GENE THE ACTIVITY OF WHICH IS NOT THE ORIGINAL ACTIVITY

(54) Titre : PROCEDE DE MODIFICATION IN VIVO DE L'ACTIVITE DE SYNTHÈSE D'UN METABOLITE PAR MODIFICATION D'UN GENE DONT L'ACTIVITE N'EST PAS L'ACTIVITE ORIGINELLE

(57) Abstract: The invention relates to a method for altering a protein X such as to modify the characteristics thereof by a) obtaining the mutants X* of the sequence coding for protein X, by means of aleatory mutagenesis, b) transformation of cells with a phenotype [P-] with vectors comprising the mutated nucleic acids obtained in step (a) which code for proteins X*, where P- signifies that said cells are auxotrophic for substance P, P being the product of the action of X on the natural substrate thereof S, c) culturing said cells in a medium comprising a substrate S*, S* being an analogue of the natural substrate S of the protein X, d) selection of the cells [P-:: X*] which have survived step c) in which the proteins X* can biosynthesise the product P from the substrate S*. The invention further relates to mutated proteins X, nucleic acids, expression vectors, host cells comprising a vector, use of N-dideoxyribosyl transferases for the transfer of a dideoxyribose (ddR) from a dideoxyribonucleoside to another nucleoside, a method for production of compounds comprising a step using a mutated protein and a strain of <i>E. coli</i>.

(57) Abrégé : Procédé pour faire évoluer une protéine X de sorte à en modifier ses caractéristiques par a) obtention de mutants X* de la séquence codant pour la protéine X par mutagénèse aléatoire, b) transformation de cellules comportant un phénotype [P-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour le protéines X*, P- signifiant que lesdites cellules sont auxotrophes pour la substance P, P étant le produit de l'action de X sur son substrat naturel S, c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat S*, S* étant un analogue du substrat naturel S de la protéine X, d) sélection des cellules [P-:: X*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines X* sont capables de réaliser la biosynthèse du produit P à partir du substrat S*, protéines X mutées, acides nucléiques, vecteurs d'expression, cellules hôtes comprenant un vecteur, utilisation de N-didéoxyribosyltransférases pour le transfert d'un didéoxyribose (ddR) d'un didéoxyribonucléoside sur un autre nucléoside, procédé de préparation de composés comprenant une étape consistant à mettre en œuvre une protéine mutée, et une souche d'*E. coli*.

WO 2004/087918 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/10 C12N9/10 A61K38/45

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBASE, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/083892 A (MARLIERE PHILIPPE ;POCHET SYLVIE (FR); BOUZON MADELEINE (FR); CENT) 24 October 2002 (2002-10-24) claims 1-6,11 ----	13,24
Y	-----	1-12,14, 21-23
Y	WO 03/025163 A (KAMINSKI PIERRE-ALEXANDRE ;MARLIERE PHILIPPE (FR); COTAYA RACHEL () 27 March 2003 (2003-03-27) page 1 -page 3; claims 1-37 ----	1-12,14, 21-23
	----	----

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2004

Date of mailing of the International search report

15/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WANG XING-GUO ET AL: "Conversion of a glutamate dehydrogenase into methionine/norleucine dehydrogenase by site-directed mutagenesis" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 268, no. 22, November 2001 (2001-11), pages 5791-5799, XP002262490 ISSN: 0014-2956 abstract</p> <p>---</p>	13
P, Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2003</p> <p>CHANG H K ET AL: "Directed evolution of Comamonas testosteroni GZ39 m-hydroxybenzoate hydroxylase for the synthesis of 4-substituted catechols." Database accession no. PREV200300546363 XP002297541 abstract</p> <p>& ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 103, 2003, pages 0-114 URL, 103RD AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY GENERAL MEETING; WASHINGTON, DC, USA; MAY 18-22, 2003 ISSN: 1060-2011</p> <p>---</p>	1-12, 14, 21-23
Y	<p>WAN LIANGLU ET AL: "In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 95, no. 22, 27 October 1998 (1998-10-27), pages 12825-12831, XP002297538 ISSN: 0027-8424 abstract</p> <p>---</p>	1-12, 14, 21-23
Y	<p>DATABASE EMBASE 'Online! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1991</p> <p>CHEN K ET AL: "Enzyme engineering for nonaqueous solvents: Random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media" Database accession no. EMB-1992050285 XP002297542 abstract</p> <p>& BIO/TECHNOLOGY 1991 UNITED STATES, vol. 9, no. 11, 1991, pages 1073-1077, ISSN: 0733-222X</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-12, 14, 21-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CARSON D A ET AL: "SYNTHESIS OF 2', 3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES BY ENZYMATIC TRANS-GLYCOSYLATION" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 155, no. 2, 15 September 1988 (1988-09-15), pages 829-834, XP002044161 ISSN: 0006-291X abstract ----	1-12,14, 21-23
Y	HUANG M-C ET AL: "ANALOGS OF 2'-DEOXYADENOSINE: FACILE ENZYMATIC PREPARATION AND GROWTH INHIBITORY EFFECTS ON HUMAN CELL LINES" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 30, no. 19, 1981, pages 2663-2671, XP002297539 ISSN: 0006-2952 abstract ----	1-12,14, 21-23
Y	FREEMAN G A ET AL: "2-amino-9-(3-azido-2,3-dideoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)-6-substituted-9H-purines: synthesis and anti-HIV activity." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY. APR 1995, vol. 3, no. 4, April 1995 (1995-04), pages 447-458, XP002297540 ISSN: 0968-0896 page 447 ----	1-12,14, 21-23
A	SHORT STEVEN A ET AL: "Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 9, 1996, pages 4978-4987, XP002262491 ISSN: 0021-9258 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/000744

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 02083892	A 24-10-2002	FR	2823219	A1	11-10-2002
		CA	2444026	A1	24-10-2002
		EP	1383890	A2	28-01-2004
		WO	02083892	A2	24-10-2002
WO 03025163	A 27-03-2003	FR	2829774	A1	21-03-2003
		CA	2460372	A1	27-03-2003
		EP	1427819	A2	16-06-2004
		WO	03025163	A2	27-03-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/000744

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/10 C12N9/10 A61K38/45

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EMBASE, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/083892 A (MARLIERE PHILIPPE ;POCHET SYLVIE (FR); BOUZON MADELEINE (FR); CENT) 24 octobre 2002 (2002-10-24) revendications 1-6,11	13,24
Y	WO 03/025163 A (KAMINSKI PIERRE-ALEXANDRE ;MARLIERE PHILIPPE (FR); COTAYA RACHEL () 27 mars 2003 (2003-03-27) page 1 -page 3; revendications 1-37	1-12,14, 21-23
Y	---	1-12,14, 21-23

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou clé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 septembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/10/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR2004/000744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WANG XING-GUO ET AL: "Conversion of a glutamate dehydrogenase into methionine/norleucine dehydrogenase by site-directed mutagenesis" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 268, no. 22, novembre 2001 (2001-11), pages 5791-5799, XP002262490 ISSN: 0014-2956 abrégé</p> <p>---</p>	13
P, Y	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne' BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2003</p> <p>CHANG H K ET AL: "Directed evolution of Comamonas testosteroni GZ39 m-hydroxybenzoate hydroxylase for the synthesis of 4-substituted catechols." Database accession no. PREV200300546363 XP002297541 abrégé</p> <p>& ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 103, 2003, pages 0-114 URL, 103RD AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY GENERAL MEETING; WASHINGTON, DC, USA; MAY 18-22, 2003 ISSN: 1060-2011</p> <p>---</p>	1-12, 14, 21-23
Y	<p>WAN LIANGLU ET AL: "In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 95, no. 22, 27 octobre 1998 (1998-10-27), pages 12825-12831, XP002297538 ISSN: 0027-8424 abrégé</p> <p>---</p>	1-12, 14, 21-23
Y	<p>DATABASE EMBASE 'en ligne' ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1991</p> <p>CHEN K ET AL: "Enzyme engineering for nonaqueous solvents: Random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media" Database accession no. EMB-1992050285 XP002297542 abrégé</p> <p>& BIO/TECHNOLOGY 1991 UNITED STATES, vol. 9, no. 11, 1991, pages 1073-1077, ISSN: 0733-222X</p> <p>---</p>	1-12, 14, 21-23

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

107/FR2004/000744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CARSON D A ET AL: "SYNTHESIS OF 2', 3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES BY ENZYMATIC TRANS-GLYCOSYLATION" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 155, no. 2, 15 septembre 1988 (1988-09-15), pages 829-834, XP002044161 ISSN: 0006-291X abrégé ---	1-12, 14, 21-23
Y	HUANG M-C ET AL: "ANALOGS OF 2'-DEOXYADENOSINE: FACILE ENZYMATIC PREPARATION AND GROWTH INHIBITORY EFFECTS ON HUMAN CELL LINES" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 30, no. 19, 1981, pages 2663-2671, XP002297539 ISSN: 0006-2952 abrégé ---	1-12, 14, 21-23
Y	FREEMAN G A ET AL: "2-amino-9-(3-azido-2,3-dideoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)-6-substituted-9H-purines: synthesis and anti-HIV activity." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY. APR 1995, vol. 3, no. 4, avril 1995 (1995-04), pages 447-458, XP002297540 ISSN: 0968-0896 page 447 ---	1-12, 14, 21-23
A	SHORT STEVEN A ET AL: "Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 9, 1996, pages 4978-4987, XP002262491 ISSN: 0021-9258 ---	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements reliés aux membres de familles de brevets

Recherche Internationale No

PCT/FR2004/000744

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02083892	A 24-10-2002	FR 2823219 A1 CA 2444026 A1 EP 1383890 A2 WO 02083892 A2	11-10-2002 24-10-2002 28-01-2004 24-10-2002
WO 03025163	A 27-03-2003	FR 2829774 A1 CA 2460372 A1 EP 1427819 A2 WO 03025163 A2	21-03-2003 27-03-2003 16-06-2004 27-03-2003